

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-97857

(43)公開日 平成5年(1993)4月20日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|-----------|-----|--------|
| C 07 D 487/22 | | 7019-4C | | |
| A 61 K 31/40 | ADU | 7252-4C | | |
| 41/00 | | 8415-4C | | |
| 49/00 | | A 8415-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数4(全16頁)

| | | | |
|----------|-----------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願平3-323597 | (71)出願人 | 591273432 東洋薄荷工業株式会社 岡山県浅口郡里庄町大字浜中75番地の1 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)10月4日 | (72)発明者 | 阪田 功 岡山県笠岡市小平井1766番地の4 |
| | | (72)発明者 | 中島 進 北海道旭川市緑が丘5条4丁目4番地の34 |
| | | (72)発明者 | 小清水 弘一 奈良県奈良市法蓮山添西町856番地の10 |
| | | (72)発明者 | 高田 弘之 岡山県浅口郡里庄町里見2098番地 |
| | | (72)発明者 | 乾 裕史 岡山県笠岡市笠岡4913番地の9 |
| | | (74)代理人 | 弁護士 高橋 三郎 |

(54)【発明の名称】 ポルフィリン誘導体とその用途

(57)【要約】

【目的】 本発明は、单一成分性、安定性、水溶性かつ特定の臓器特に癌への親和性に優れ、正常組織からの排出速度が速く光毒性を低減させることができ、しかもチタンサファイアレーザー(670nm以上600nm以下の波長)の使用が可能であるポルフィリン誘導体を合成・探索し、光物理化学的診断治療(PDT)に適した光増感剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、アルコキシポルフィリンアミノ酸誘導体およびそれらの金属錯体、ならびに血液由来のプロトポルフィリンより合成誘導体化したアルデヒド基担持クロリン類に付加あるいは縮合させて得られたポルフィリン誘導体で構成される。

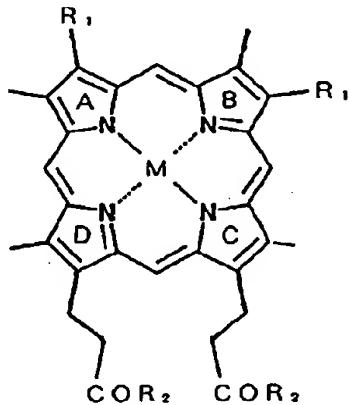
1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I) 化1

(式中、 R_1 は $CH(OR)CH_3$ 、 R_2 はアミノ酸から水素を除いた残基、 R はアルキル、 M は $2H$ 、 G 、 a 、 Zn 、 Pd 、 In 、 Sn)で示されるポルフィリン化合物またはそれらの金属錯体。

【化1】

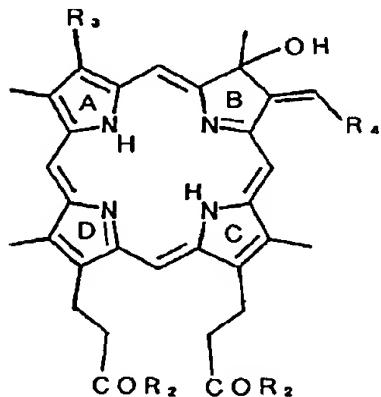


【請求項2】 一般式 (II) 化2

(式中、 R_3 は $CH=CH_2$ 、 $CH(OR)CH_3$ 、 $COHO$ 、 $CH=NOH$ または CH_2OH 、 R_4 は $CH=X$ 、 $C(OH)OSO_2Na$ 、 $CH(SCH_2-COOH)_2$ 、 $CH(OR)_2$ または化3、 X は O 、 $C(CN)_2$ 、 $N-W$ または $C(Y)Z$ 、 W は OH 、 $OCOCH_3$ または $NH-E$ 、 E は H 、アルキル、 $COOC_6H_4N$ 、 $CONH_2$ 、 $CSNH_2$ 、 $COOCH_3$ 、 $COCH_2NC1(CH_3)_2$ または $C(NH_2)=NH$ 、

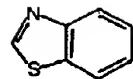
Y は H またはアルキル、 Z は NO_2 または COF 、あるいは化4で示す環状構造、 F はメチル、フェニル、アミノフェニルまたはヨノンの残基、 R_2 は O 、アミノ糖またはアミノ酸から水素を除いた残基、 R はアルキル)で示されるポルフィリン化合物。(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む。)

【化2】



2

* 【化3】



【化4】



【請求項3】 請求項1および2記載のポルフィリンおよび金属ポルフィリン化合物からなる光物理化学的診断用および/または治療用増感剤。

【請求項4】 癌の診断および/または治療に使用される請求項3記載の光物理化学用増感剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ポルフィリン誘導体とその用途、特に新規なポルフィリンおよび金属ポルフィリン誘導体を有効成分とする光物理化学的診断用および治療用の増感剤および/または光物理化学による癌の診断および治療に用いる薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 癌の新しい治療法として光物理化学的診断治療(PDT)が行われている。これはある種のポルフィリン化合物を静脈注射などの方法により投与し、癌組織に保持させた後、レーザー光を照射して癌組織のみを選択的に破壊するというものである。PDTは、ポルフィリンの癌組織に保持される時間が正常組織に比べて長いという性質と光増感作用を持つという2つの性質を利用している。過去13年間に世界中で3000人以上の人々がPDTによる悪性腫瘍の治療を受けており、癌治療法の1つとして定着しつつある。PDTにより良好な治療成績が報告されている癌種は、網膜癌、皮膚癌、食道癌、表在性膀胱癌、初期の肺癌など多岐に渡っている。

【0003】 現在PDTに使用されている薬剤は主としてヘマトポルフィリン誘導体(HPD)およびそのエーテル体および/またはエステル体の二量体である。HPDはヘマトポルフィリンを酢酸中硫酸処理し、さらに0.1N水酸化ナトリウムで処理して得られる混合物である。二量体はHPDの疎水性の高い成分を主として含んでおり、HPDとともに複雑な混合物であり活性成分が不明である。また成分比が一定でないために治療効果が極めて不安定である。

【0004】 一方、PDTのための新しいポルフィリン誘導体として、 R_1 が低級アルキル基、 R_2 が4級アンモニウム塩誘導体であるものが特開平1-246286号、昭63-145283号、昭62-205082号および昭62-167783号に、 R_1 としてエーテル結合を持った誘導体であるものが特開昭62-249986号、昭62-246580号、昭62-246579号および昭62-205081号に、そしてJ. F.

50

Evensenらにより [Br. J. Cancer, 55, 483 (1987)] に開示されている。また、クロリン誘導体が特開平1-250381号、昭63-290881号、昭62-5986号、昭62-5985号、昭62-5924号、昭62-5912号、昭58-981号および昭57-185220号に、ポルフィリンダイマー誘導体が米国特許4649151号(1987)、特開昭62-63586号および昭60-500132号に、ポルフィリン金属錯体が特開平1-221382号、昭63-104987号および昭57-31688号に開示されている。我々も種々検討し、クロリン誘導体を特開昭61-7279号および昭60-92287号に、ポルフィリン金属錯体を特開平2-13820号、平2-76881号、昭62-182663号、昭62-174079号および昭61-83185号に、バクテリオクロリン誘導体を特開昭63-196586号に開示してきた。しかしながら、PDT用の増感剤として用いるには上記化合物では合成、安定性、水溶性の面において実用化が困難であった。

【0005】またPDTに使われるレーザー光の組織透過性の問題もある。HPDやその二量体は最大吸収波長が630nmであり、モル吸光係数も3000と低い。630nmの光では組織透過性が悪く、PDTの治療効果が5~10mmの表層癌に限定されてしまっている。

【0006】一方レーザー装置の方にも問題がある。現在最もよく使用されている色素レーザーは安定性が悪く、運用上取扱いが難しい。最近注目を集めているチタンサファイアレーザーを用いれば運用がかなり簡単になる。しかしこのレーザーを用いると670nm以上600nm以下の吸収波長に限られ、630nm付近の吸収波長を持つHPDやその二量体に適用できない。

【0007】更に薬剤の副作用として一時的な光過敏症を引き起こすことが知られている。このため薬剤投与後、皮膚などの正常組織が光増感作用で破壊されないように患者を長期間暗所に閉じ込めておかなければならぬ。HPDおよびその二量体は正常組織からの排出速度が遅いので長いときには6週間以上も光過敏症が残ることもある。現在使用されている薬剤はこうした多くの問題点を抱えておりHPDおよびその二量体に代わる新しい薬剤の開発が強く望まれている。そこで上記薬剤が持つ欠点を克服するものとして単一化合物でありかつより長波長領域(650~800nm)に吸収を持つ化合物が第2世代の薬物として提案されている。現在フタロシアニンなどのアザポルフィリン類、クロリン・バクテリオクロリンなどのポルフィリン類、テキサフィリンなどの環拡張型ポルフィリン類などさまざまな化合物がHPDやその二量体に代わる薬剤として研究されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、単一成分であり安定かつ癌組織に対する良好な集積性を維持し

たまま、正常組織からは排出速度が速く光毒性を低減させ、しかもできうればチタンサファイアレーザー(670nm以上600nm以下の波長)の使用が可能であるポルフィリン誘導体を探索し、PDTに適した光増感剤を提供することを目的として、種々の研究を重ねた。

【0009】

【問題を解決するための手段】その結果、前願誘導体[特開平2-138280号、米国出願375482号(1989)、欧州出願89112955.3号(1989)]の中で多官能性基を有する特定の側鎖を結合させたある種の金属ポルフィリン誘導体、およびポルフィリン誘導体ならびに血液由来のプロトポルフィリンより合成誘導体化したクロリン類にある種のアルコキシル基あるいは種々の官能基を持つ基、アミノ酸残基を有する特定の側鎖を結合させると、単一成分で、癌組織に対して優れた集積性と正常組織より良好な排出性を、しかも金属ポルフィリン誘導体については600nm以下、合成クロリン化誘導体については670nm以上の吸収波長を持ち、かつ良好なPDT効果を有することを見出した。

【0010】また本発明者らは本研究開発途中で、ポルフィリンとアルブミンの混液の紫外線吸収(UV)スペクトルを分析したところ、スペクトルの動向が特定臓器特に癌への親和性と一定の法則があることを見出した。

【0011】本発明は上記の知見に基づいて完成されたものであって、その要旨は

一般式 (I) 化1

(式中、R₁はCH(OR)CH₃、R₂はアミノ酸から水素を除いた残基、Rはアルキル、Mは2H、Ga、Zn、Pd、In、Sn)で示されるポルフィリン化合物またはそれらの金属錯体。

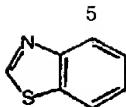
一般式 (II) 化2

(式中、R₃はCH=CH₂、CH(OR)CH₃、CH₂OHまたはCH₂OH、R₄はCH=X、C(OH)OSO₂Na、CH(SCH₂-COOH)₂、CH(OR)₂または化5、XはO、C(CN)₂、N-WまたはC(Y)Z、WはOH、OCOCH₃またはNH-E、EはH、アルキル、CO₂H、CONH₂、CSNH₂、COOCH₃、COCH₂NC₁(CH₃)₂またはC(NH₂)=NH、

YはHまたはアルキル、ZはNO₂またはCOF、あるいは化6で示す環状構造、Fはメチル、フェニル、アミノフェニルまたはヨノンの残基、R₂はOH、アミノ糖またはアミノ酸から水素を除いた残基、Rはアルキル)で示されるポルフィリン化合物に存する。(但し、式中、4つのテトラピロール環のうちA及びB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった位置異性体も含む。)

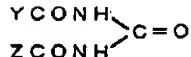
【0012】

【化5】



【0013】

【化6】



【0014】上記各記号の意味に関する使用された「アルキル」なる語は炭素数20以下、好ましくは炭素数1～18のアルキル（例えばメチル、エチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ウンデシル、ドデシル、テトラデシル、オクタデシル等）を意味する。「アミノ酸」なる語は必須アミノ酸を意味する。

【0015】本発明のポルフィリン化合物は、自体常套によって製造することができる。一般式(I)に対応するポルフィリン化合物にあっては、R₁を有するものを構成し（工程a）、ついでそのまま次の工程cに進むかまたはこれに金属を導入し（工程b）、得られたポルフィリン化合物およびそれらの金属錯体のR₂にアミノ酸の残基を結合せしめる（工程c）。また必ずしも工程(a)、(b)、(c)と順次反応せしめる必要もなく、例えば工程(b)、(a)、(c)または工程(a)、(c)、(b)のように工程順が代わっても良い。

【0016】一方、一般式(I I)に対応するポルフィリン化合物にあっては、まずR₂を有するものを構成し（工程d）、ついでこれをR₄特にアルデヒド基を有する化合物に誘導体化し（工程e）、得られたクロリン誘導体に種々の化合物を付加または縮合させ（工程f）、そして必要あらばアミノ糖やアミノ酸の残基を結合せしめる（工程c）。

【0017】構成工程(a、b、dおよびe)はJ. E. Falk著[Porphyrins and Metalloporphyrins] (Elsevier発行、1975年) およびD. Dolphin著[The Porphyrins] (Academic Press発行、1978年) 等に記載された常套の方法によってこれを行うことができる。

【0018】例えば(I)に対応するR₁を有するポルフィリン化合物およびそれらの金属錯体であるものは、特開昭61-7279号、特開昭61-83185号、特許公報昭63-13997号、特開平2-76881号、特開平2-138280号および特願平2-1684990号に記載された方法に従ってこれを調製すれば良い。すなわち工程(a)についてはポルフィリン化合物(I)のR₁側鎖にR₂を導入すればよく、あらかじめ(I)のB_r誘導体を調製し、これとアルコール類の水酸基との間で反応を進行させるか、またはルイス酸を用いて反応させることが好ましいが、これにとらわれるとはない。工程(b)については通常、金属の塩化物、

10

6

酢酸塩、硫酸塩、硝酸塩等を使用してこれを行う。金属の種類としては、発光寿命をのばす効果があるGa、Zn、Pd、In、Snなどがあげられる。またこの金属導入工程(b)は(a)工程の前後を問わず、必要に応じ調製して良い。例えば、先ず金属導入工程(b)を行い、ついで金属ポルフィリン化合物のB_r誘導体を調製しこれとアルコール類との間で反応させるか、またはルイス酸を用いてアルコール類との反応（工程a）を進行させても何ら問題はない。人為的に合成する代わりに、植物や動物のような天然資源からこれを採取してもよい。

【0019】以上のようにして構成したポルフィリン化合物およびその金属錯体を次にアミノ酸の残基の結合工程(c)に付す。すなわち、R₂が水酸基であるポルフィリン化合物またはその金属錯体(I)にアミノ酸を反応させて、R₂がアミノ酸担持ポルフィリン化合物またはその金属錯体(I)を製造する。このものは泉屋ら著[ペプチド合成の基礎と実験]（丸善発行、1985年）等に記載された常套の方法によってこれを行うことができ、特開昭64-61481号、特開平2-76881号、特開平2-138280号および特願平2-168499号に記載された方法に従ってこれを調製すればよい。人為的に合成する代わりに、植物や動物のような天然資源からこれを採取してもよい。

20

【0020】この場合、要はポルフィリン化合物の側鎖にアミノ酸の残基を導入すればよいから、(I)のR₂側鎖のカルボキシル基とアミノ酸のアミノ基との間で反応を進行させることができ好ましく、このため前者のカルボキシル基および/または後者のアミノ基を常套の反応性基に変換したり、両者に存在する反応に関与することが好ましくない官能基を適宜に保護することが考慮されてよい。なお、いずれの場合も適宜脱水剤や脱酸剤のような反応促進剤や縮合剤の使用も考慮されてよい。

30

【0021】以下、代表例を挙げてポルフィリン化合物およびそれらの金属錯体(I)の調製を更に具体的に説明する。例えば、R₂が水酸基を持ったポルフィリン化合物およびその錯体（特開昭61-7279号、昭61-83185号、特許公報昭63-13997号、特開平2-76881号、特開平2-138280号または特願平2-168499号）にアミノ酸メチルエステル等を溶媒中で縮合剤[例えばジシクロヘキシカルボジイミド(DCC)や水溶性カルボジイミド(WS-C)]等を用いて反応せしめて、R₂の側鎖にアミノ化合物が結合したポルフィリン化合物またはそれらの金属錯体(I)を得る。その具体例としては以下のものを挙げることができる。

40

【0022】(1) 2、4-ビス(1-プロポキシエチル)-デューテロポルフィニルジアスパラギン酸(以下C₃-DP-diAspと言う)
(2) 2、4-ビス(1-ブトキシエチル)-デューテ

50

ロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₄-D P-d i A s pと言ふ)

(3) 2、4-ビス (1-ベンチルオキシエチル) - デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 (以下C₆-D P-d i A s pと言ふ)

(4) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 (以下C₆-D P-d i A s pと言ふ)

(5) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 (以下C₈-D P-d i A s pと言ふ)

(6) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 (以下C₁₀-D P-d i A s pと言ふ)

(7) 2、4-ビス (1-ブトキシエチル) - G a - デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 (以下C₄-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(8) 2、4-ビス (1-ベンチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジセリン (以下C₆-G a-D P-d i S e rと言ふ)

(9) 2、4-ビス (1-ベンチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₅-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(10) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₆-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(11) 2、4-ビス (1-ヘプチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₇-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(12) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジグリシン (以下C₈-G a-D P-d i G l yと言ふ)

(13) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジセリン (以下C₈-G a-D P-d i S e rと言ふ)

(14) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₈-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(15) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジグルタミン酸 (以下C₈-G a-D P-d i G l uと言ふ)

(16) 2、4-ビス (1-オクチルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジチロシン (以下C₈-G a-D P-d i T y rと言ふ)

(17) 2、4-ビス (1-ノニルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₉-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(18) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₀-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(19) 2、4-ビス (1-ドデシルオキシエチル) - G a - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₂-G a-D P-d i A s pと言ふ)

(20) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - Z n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₆-Z n-D P-d i A s pと言ふ)

(21) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - P d - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₆-P d-D P-d i A s pと言ふ)

(22) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - I n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₆-I n-D P-d i A s pと言ふ)

(23) 2、4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) - S n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₆-S n-D P-d i A s pと言ふ)

(24) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - Z n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₀-Z n-D P-d i A s pと言ふ)

(25) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - P d - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₀-P d-D P-d i A s pと言ふ)

(26) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - I n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₀-I n-D P-d i A s pと言ふ)

(27) 2、4-ビス (1-デシルオキシエチル) - S n - デューテロポルフィニル ジアスパラギン酸 (以下C₁₀-S n-D P-d i A s pと言ふ)

【0023】一方、(II)に対応するR₃のRを有するポルフィリン化合物であるものは、前述のa工程に記載された方法に従ってこれを調製すれば良い。またR₃のアルデヒド基以下に記載の化合物については、プロトポルフィリン ジメチルエステル (以下P P-M eと言ふ) を光化学反応処理して1-ヒドロキシ-2-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン ジメチルエステル (以下フォトプロトポルフィリン ジメチルエステルと言ふ) を調製し (工程e) 、次いでこれを還元後、過ヨウ素酸等の酸化剤で2-ホルミル-4-ビニル-デューテロポルフィリンジメチルエステル (以下スピログラフイスピロルフィリン ジメチルエステルと言ふ) とする (工程d)。(ただし、4つのテトラピロール環のうちAおよびB環の側鎖の官能基がそれぞれ入れ替わった4-ホルミル-2-ビニル体も含む。) クロリン化工程(e)については光化学反応を利用するのが好ましく、R₄がアルデヒド基を有するクロリン化合物 (フォトプロトポルフィリン) を得る。人為的に合成する代わりに、植物や動物のような天然資源からこれを採取してもよい。

【0024】次に、以上のようにして構成したクロリン化合物を付加および/または縮合工程(f)に付す。すなわちR₄がアルデヒド基であるポルフィリン化合物

(11) に、亜硫酸水素ナトリウム、メルカプタール、アルコール等を反応させて付加体ポルフィリン化合物を、またヒドロキシルアミン、ヒドラジン、マロン酸誘導体等を反応させて縮合体ポルフィリン化合物を製造する。このものは一般有機化学実験書中〔アルコール、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、セミカルバゾン、アミノチオフェノール、マロン酸エステル等とアルデヒド化合物との付加または縮合反応〕に記載された常套の方法によってこれを行なうことができる。なお、いずれの場合も適宜脱水剤や脱酸剤のような反応促進剤や縮合剤の使用も考慮されてよい。

【0025】以下、代表例を挙げてポルフィリン化合物(I I)の調製を更に具体的に説明する。例えばR₄がアルデヒド基を持ったクロリン化合物(フォトプロトポルフィリン誘導体)に亜硫酸水素ナトリウム等を溶媒中で反応せしめ、亜硫酸水素ナトリウムが付加したポルフィリン化合物(I I)を得る。一方、フォトプロトポルフィリン誘導体にアミノ基を持つ化合物(例えばヒドロキシルアミン、ヒドラジン誘導体、セミカルバジド、アミノチオフェノール等)や活性水素基を持つ化合物(例えばマロンニトリル、バルビツール酸、アセトン、アセトフェノン、アミノアセトフェノン、ヨノン等)を溶媒中で縮合剤(例えばピリジン、ピペリジン、酸、アルカリ等)を用いて反応せしめて、R₄の側鎖にこれらの化合物が縮合したポルフィリン化合物(I I)を得る。その具体例としては以下のものを挙げることができる。

【0026】(28) 2-ビニル-3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン ジメチルエステル(フォトプロトポルフィリン ジメチルエステル)亜硫酸水素ナトリウム付加物(以下NaHSO₃-P-Meと言う)

(29) フォトプロトポルフィリン ジメチルエステル 酢酸メルカプタール(以下HOAcS-P-Meと言う)

(30) フォトプロトポルフィリン ジエチルアセタール(以下EtO-Pと言う)

(31) 2-(1-ヘキシルオキシエチル)-3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン(C₆-フォトプロトポルフィリン)(以下C₆-Pと言う)

(32) C₆-フォトプロトポルフィリン ジアスパラギン酸(以下C₆-P-diAspと言う)

(33) 2-(1-デシルオキシエチル)-3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン(C₁₀-フォトプロトポルフィリン)(以下C₁₀-Pと言う)

(34) C₁₀-フォトプロトポルフィリン ジアスパラギン酸(以下C₁₀-P-diAspと言う)

(35) フォトプロトポルフィリン オキシム(以下NOH-Pと言う)

(36) 2-ホルミル-3-ヒドロキシ-4-ホルミルエチリデン-プロトポルフィリン(スピログラフィスフォトプロトポルフィリン)(以下SPと言う)

(37) フォトプロトポルフィリン 塩化トリメチルアセトヒドラゾン(以下G' THZ-Pと言う)

(38) フォトプロトポルフィリン ヒドロオキサム酸(以下N₂O₂H-Pと言う)

(39) スピログラフィスフォトプロトポルフィリンジオキシム(以下2NOH-SPと言う)

(40) フォトプロトポルフィリン 酢酸オキシム(以下NOAc-Pと言う)

(41) フォトプロトポルフィリン t-ブチルヒドラゾン(以下BuHZ-Pと言う)

(42) フォトプロトポルフィリン グアニルヒドラゾン(以下GHZ-Pと言う)

(43) フォトプロトポルフィリン ニコチン酸ヒドラゾン(以下NHZ-Pと言う)

(44) フォトプロトポルフィリン ニコチン酸ヒドラゾン ジアスパラギン酸(以下NHZ-P-diAspと言う)

(45) フォトプロトポルフィリン 炭酸ヒドラゾン(以下CHZ-Pと言う)

(46) フォトプロトポルフィリデン バルビツール酸(以下BA-Pと言う)

(47) フォトプロトポルフィリン セミカルバゾン(以下NH₂CONHN-Pと言う)

(48) フォトプロトポルフィリン チオセミカルバゾン(以下NH₂C₂SNHN-Pと言う)

(49) フォトプロトポルフィリン ベンゾチアゾール(以下BT-Pと言う)

(50) フォトプロトポルフィリン マロンニトリル(以下MCN-Pと言う)

(51) フォトプロトポルフィリデン ニトロメチレン(以下NO₂-Pと言う)

(52) フォトプロトポルフィリデン ニトロエチレン(以下MeNO₂-Pと言う)

(53) フォトプロトポルフィリデン ニトロプロピレン(以下EtNO₂-Pと言う)

(54) フォトプロトポルフィリデン アセトン(以下Me₂CO-Pと言う)

(55) フォトプロトポルフィリデン アセトン ジアスパラギン酸(以下Me₂CO-P-diAspと言う)

(56) フォトプロトポルフィリデン ヨノン ジアスパラギン酸(以下I₀-P-diAspと言う)

(57) フォトプロトポルフィリデン ヨノンオキシム ジアスパラギン酸(以下NOH-I₀-P-diAspと言う)

(58) フォトプロトポルフィリデン アセトフェノン(以下PhCO-Pと言う)

(59) フォトプロトポルフィリデン アミノアセトフェノン (以下 $\text{NH}_2\text{PhCO}-\text{P}$ と言う)

(60) フォトプロトポルフィリニルオキシム アミノグルコース (以下 $\text{NOH}-\text{P}-\text{NHg}$ 1 u と言う)

【0027】本発明によるポルフィリン誘導体の医薬品製剤の製造は自体公知法により行われ、本発明による誘導体を適当な緩衝液で溶解するだけよい。好適な添加物として例えば医薬的に認容できる溶解補助剤 (例えば有機溶媒) 、pH調製剤 (例えば酸、塩基、緩衝液) 、安定剤 (例えばアスコルビン酸) 、賦形剤 (例えばグルコース) 、等張化剤 (例えば塩化ナトリウム) などが配合されても良い。

【0028】本発明による薬剤はPDT用薬剤としての必要十分な特性すなわち長燃光寿命、アルブミンに対する親和性、特定臓器特に癌に対する特異的集積性、光殺細胞効果、吸収波長、水溶性、純度などを充分満足しているものである。本発明による薬剤の良好な水溶性は、高濃度溶液 (50 mg/m1) の製造を可能とし、更に本発明による薬剤は試験管内だけでなく生体内でも高い安定性を示す。一般に、PDT用薬剤として適用するためには本発明の薬剤を1 mg～5 mg/kg 体重の量で投与するのが望ましい。

【0029】

【作用】本発明にかかるポルフィリン化合物は、ポルフィリン骨格の側鎖にアルコキシ残基・アミノ酸残基、またはアルデヒド残基およびその付加体・縮合体あるいはポルフィリン骨格内に金属錯体を有する点に化学構造上の特徴を有し、その結果種々の生理学的もしくは薬理学的特性を発揮する。

【0030】これらポルフィリン誘導体は癌細胞に選択的に集積し、かつ癌細胞からの排泄が遅い。なお、正常な臓器や細胞からは速やかに排泄されるため、それらに損傷を与えることはない。元来、ポルフィリン誘導体の殆どものは光に対して強い作用を有するが、本発明に従ってポルフィリン誘導体の側鎖に多官能性化合物残基を導入することによって正常組織からの排泄性を高めるとともに、光毒性の発現を極力抑制するようデザインした誘導体が可能となった。また、ポルフィリンをクロリン誘導体化して波長がレッドシフトすることにより治療効果の深達度をはかることができた。これらの特性 (癌親和性、光殺細胞効果、吸収波長、水溶性) に基づき、本発明のポルフィリン誘導体は特定の臓器、特に癌や悪性腫瘍に対するPDT薬剤として有用である。

【0031】

【実施例】

実施例 1

ポルフィリン化合物 (1) の合成

特開平2-138280号および特願平2-16849号に掲げた方法により合成した。出発原料としてプロトポルフィリンジメチルエステル (以下 PP-Me と

言う) 5 g を用い、これに 10% 噴化水素酸/酢酸 30 ml を加え一昼夜攪拌した。続いて反応溶液を減圧濃縮し、残渣にアルコール類 (例えばヘキシルアルコール $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{OH}$) 18 ml を加えて、室温下、一昼夜攪拌反応した。(ポルフィリン誘導体へのアルコール残基の導入) 反応後、残渣を 2 N 水酸化カリウム/エタノール溶液 60 ml を加えて加水分解を行った。(エステルのケン化)

1 N 塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: n-ヘキサン-酢酸エチルステップワイズ法) にて精製して、2, 4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) 一デューテロポルフィリンを得た。(3.3 g)

得られたアルコキシ体全量を常法によりジシクロヘキシルアミン (DCHA) で DCHA 塩とした。本 DCHA 塩全量をクロロホルム 30 ml およびアセトニトリル 15 ml を加えて溶解した。次いでアスパラギン酸ジメチルエステル [Asp (OMe)₂] 塩酸塩 3 g を加え、攪拌下に WSC 1.8 g を徐々に加えて 2 時間反応せしめた。反応後、反応液を水洗、分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再結晶化を行い、2, 4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) 一デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 テトラメチルエステルを得た。得られたアミド体全量を常法により、2 N 水酸化カリウム/エタノール溶液で加水分解を行い目的物の粗結晶を得た。次いで、この粗結晶をオクチルシリカゲル

(C₆) 中圧高速分取液体クロマトグラフィー [溶離液: メタノール-水 (9:1)] にて精製を行い、2, 4-ビス (1-ヘキシルオキシエチル) 一デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 [C₆-D P-d i A s p (4)] を得た。(3.43 g、全収率 40.6%)

【0032】実施例 2

金属ポルフィリン化合物 (1) の合成

特開平2-138280号および特願平2-16849号に掲げた方法を改良して合成した。出発原料として PP-Me 30 g を用い、ガリウム錯体化後、これに 10% 噴化水素酸/酢酸 300 ml を加え一昼夜攪拌した。続いて反応溶液を減圧濃縮し、残渣にメタノール 200 ml を加えて、室温下、一昼夜攪拌反応した。(ポルフィリン誘導体へのメトキシ基の導入) 水を加えて赤紫色沈殿物を生成せしめ濾取した。(30 g)

沈殿物にアルコール類 (例えばデシルアルコール $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{OH}$) 150 ml を加えて、ルイス酸 (例えば塩化第二スズ) 触媒下、加温攪拌反応した。(メトキシポルフィリン誘導体へのアルコール残基の交換反応) 反応後、反応液を抽出減圧濃縮し、残渣を 2 N 水酸化カリウム/エタノール溶液 60 ml を加えて加水分解を行った。(エステルのケン化)

1 N塩酸で中和後、一昼夜冷蔵庫で静置すると赤紫色の沈殿が生成した。沈殿物を濾取し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液；n-ヘキサン-酢酸エチルステップワイズ法）にて精製して、2, 4-ビス（1-デシルオキシエチル）-デューテロポルフィリンのガリウム錯体を得た。（14. 4 g）

得られた錯体全量を実施例1と同様にアミド化、加水分解、精製の操作を行い、2, 4-ビス（1-デシルオキシエチル）-G a-デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 [C₁₀-G a-D P-d i A s p (18)]を得た。（15. 7 g、全収率25. 5%）

【0033】実施例 3

フォトプロトポルフィリンの合成

R. K. Dineillの方法 [The Porphyrins, Academic Press発行, Vol. 1, 303 (1978)] に準じて合成した。P P-Me 100 gをクロロホルム101に溶解し、光照射下一週間反応させた。（ポルフィリンからクロリン誘導体化）反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液；n-ヘキサン-クロロホルム）にて精製して、1 (3) -ヒドロキシ-2 (4) -ホルミルエチリデン-プロトポルフィリンジメチルエステル（フォトプロトポルフィリンジメチルエステル、以下P-Meと言う）を得た。（50. 0 g）続いて、これをピリジン・メタノール混液中で加水分解して暗緑色結晶のフォトプロトポルフィリン（以下Pと言う）を得た。（43. 0 g、全収率47. 4%）

【0034】実施例 4

実施例3で得られたP-Me 300 mgをピリジン150 mlに溶解し、搅拌下に30%亜硫酸水素ナトリウム水溶液30 mlを徐々に加え3時間反応させた。反応液を20%クエン酸溶液で中和後、クロロホルムで抽出し水洗後減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにより結晶化を行い、NaHSO₃-P-Me (28)を得た。（50 mg、14. 3%）

【0035】実施例 5

10%臭化水素酸/酢酸の代わりに3%のそれを用いる以外は実施例1と同様に処理し、合成中間体としてヘキシルアルコールからは2-(1-ヘキシルオキシエチル)-4-ビニル-デューテロポルフィリンを、デシルアルコールからは2-(1-デシルオキシエチル)-4-ビニル-デューテロポルフィリンをそれぞれ4 g得た。得られたモノアルコキシ体全量を実施例3と同様にして光照射反応を行い後処理し、C₆-P (31) およびC₁₀-P (33)を得た。（0. 88 g、21. 0%および1. 1 g、6. 5%）これら光酸化反応物 [31 (0. 8 g)、33 (1. 0 g)]をそれぞれ別々に実施例1と同様に操作し、アミド化ならびに加水分解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液；n-ヘキサン-酢酸エチルステップワイズ法）にて精製して、2, 4-ビス（1-デシルオキシエチル）-G a-デューテロポルフィニルジアスパラギン酸 [C₁₀-G a-D P-d i A s p (18)]を得た。（15. 7 g、全収率25. 5%）

【0036】実施例 6

実施例3で得られたP 300 mgをピリジン100 mlに溶解し、室温搅拌下に30%ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加えて30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH-P (35)を得た。（250 mg、81. 3%）

【0037】実施例 7

P-Me 1 gをクロロホルム300 mlに溶解し、室温搅拌下に5%ナトリウムボロハイドライドのメタノール溶液20 mlを滴下後30分間反応せしめた。反応後、反応液に10%クエン酸水溶液を加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をジオキサン100 mlに溶解し、10%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液10 mlおよび3%塩酸40 mlを加え、室温で18時間放置した。反応溶液中に再結晶した紫色結晶を濾取し、水洗乾燥後クロロホルム120 mlに溶解し、光照射下48時間反応させた。反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶離液；クロロホルム-アセトン）にて精製し、SPジメチルエステル150 mgを得た。得られたSPジメチルエステル全量をピリジン30 mlに溶解し、10%水酸化ナトリウム水溶液5 mlを加えて加水分解し、20%クエン酸水溶液にて中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、SP (36)を得た。（120 mg、12. 5%）

【0038】実施例 8

P 200 mgをメタノール40 mlに溶解し、室温搅拌下にジラード試薬T 400 mgを加えて1時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、G' THZ-P (37)を得た。（200 mg、79. 9%）

【0039】実施例 9

P 300 mgをメタノールに溶解し、室温搅拌下にベンゼンスルホヒドロキサミン酸300 mgと1N水酸化ナトリウム4 mlを加えて18時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、N2OH-P (38)を得た。（60 mg、19. 0%）

【0040】実施例 10

実施例7の中間体として得られるSPジメチルエス

解処理し、C₆-P-d i A s p (32) およびC₁₀-P-d i A s p (34)を別々に得た。（450 mg、42. 3%および160 mg、12. 3%）

【0036】実施例 6

実施例3で得られたP 300 mgをピリジン100 mlに溶解し、室温搅拌下に30%ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加えて30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH-P (35)を得た。（250 mg、81. 3%）

【0037】実施例 7

P-Me 1 gをクロロホルム300 mlに溶解し、室温搅拌下に5%ナトリウムボロハイドライドのメタノール溶液20 mlを滴下後30分間反応せしめた。反応後、反応液に10%クエン酸水溶液を加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をジオキサン100 mlに溶解し、10%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液10 mlおよび3%塩酸40 mlを加え、室温で18時間放置した。反応溶液中に再結晶した紫色結晶を濾取し、水洗乾燥後クロロホルム120 mlに溶解し、光照射下48時間反応させた。反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶離液；クロロホルム-アセトン）にて精製し、SPジメチルエステル150 mgを得た。得られたSPジメチルエステル全量をピリジン30 mlに溶解し、10%水酸化ナトリウム水溶液5 mlを加えて加水分解し、20%クエン酸水溶液にて中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、SP (36)を得た。（120 mg、12. 5%）

【0038】実施例 8

P 200 mgをメタノール40 mlに溶解し、室温搅拌下にジラード試薬T 400 mgを加えて1時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、G' THZ-P (37)を得た。（200 mg、79. 9%）

【0039】実施例 9

P 300 mgをメタノールに溶解し、室温搅拌下にベンゼンスルホヒドロキサミン酸300 mgと1N水酸化ナトリウム4 mlを加えて18時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、N2OH-P (38)を得た。（60 mg、19. 0%）

【0040】実施例 10

実施例7の中間体として得られるSPジメチルエス

【0036】実施例 6

実施例3で得られたP 300 mgをピリジン100 mlに溶解し、室温搅拌下に30%ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液を加えて30分間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH-P (35)を得た。（250 mg、81. 3%）

【0037】実施例 7

P-Me 1 gをクロロホルム300 mlに溶解し、室温搅拌下に5%ナトリウムボロハイドライドのメタノール溶液20 mlを滴下後30分間反応せしめた。反応後、反応液に10%クエン酸水溶液を加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をジオキサン100 mlに溶解し、10%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液10 mlおよび3%塩酸40 mlを加え、室温で18時間放置した。反応溶液中に再結晶した紫色結晶を濾取し、水洗乾燥後クロロホルム120 mlに溶解し、光照射下48時間反応させた。反応後減圧濃縮し、残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶離液；クロロホルム-アセトン）にて精製し、SPジメチルエステル150 mgを得た。得られたSPジメチルエステル全量をピリジン30 mlに溶解し、10%水酸化ナトリウム水溶液5 mlを加えて加水分解し、20%クエン酸水溶液にて中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、SP (36)を得た。（120 mg、12. 5%）

【0038】実施例 8

実施例7の中間体として得られるSPジメチルエス

【0039】実施例 9

P 200 mgをメタノール40 mlに溶解し、室温搅拌下にジラード試薬T 400 mgを加えて1時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、G' THZ-P (37)を得た。（200 mg、79. 9%）

【0040】実施例 10

実施例7の中間体として得られるSPジメチルエス

ル 500 mg をピリジン 100 ml に溶解し、室温搅拌下に 30% ヒドロキシルアミン塩酸塩水溶液 10 ml を加えて 30 分間反応せしめた。反応後、反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH - SP ジメチルエステル 450 mg を得た。得られた NOH - SP ジメチルエステルを常法により加水分解を行った。1 N 塩酸で中和後、クロロホルムにて分液し、クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール - 酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、2 NOH - SP (39) を得た。(180 mg, 35.9%)

【0041】実施例 11

実施例 6 で得た NOH - P 100 mg をピリジン 20 ml に溶解し、室温搅拌下に無水酢酸 1 ml を加えて 6 時間反応せしめた。反応後、反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NOAc - P (40) を得た。(60 mg, 19.0%)

【0042】実施例 12

P 200 mg をピリジン 50 ml に溶解し、室温搅拌下に t - ブチルヒドラジン 400 mg および 10% アミノグアニジン塩酸塩水溶液 4 ml をそれぞれ別々に加えて 18 時間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液にクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物を酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、BuHZ - P (41) および GHZ - P (42) を得た。(80 mg, 35.7% および 190 mg, 87.2%)

【0043】実施例 13

P 200 mg をピリジン 20 ml に溶解し、ニコチン酸ヒドラジド 730 mg およびカルバジン酸 メチルエステルをそれぞれ別々に加えて 50℃ 加温搅拌下 3 時間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物をメタノール - 酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NHZ - P (43) および CHZ - P (45) を得た。(33 mg, 13.8% および 130 mg, 58.0%)

【0044】実施例 14

実施例 13 で得た NHZ - P 930 mg を常法により DCHA 塩とした。本 DCHA 塩全量をクロロホルム 50 ml およびアセトニトリル 25 ml を加えて溶解した。次いでアスパラギン酸 ジメチルエステル 塩酸塩 930 mg を加え、搅拌下に、WSC 1.5 g を徐々に加えて反応せしめた。反応後、反応液を水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をピリジンに溶解し、常法により 10% 水酸化ナトリウム水溶液にて加水

分解を行った。20% クエン酸水溶液で中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール - 酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NHZ - P - d i A s p (44) を得た。(870 mg, 71.0%)

【0045】実施例 15

P 150 mg をピリジン 20 ml に溶解し、室温搅拌下にバルビツール酸 150 mg およびマロンニトリル 20 ml をそれぞれ別々に加えて 30 分間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物を酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、BA - P (46) および MCN - P (50) を得た。(20 mg, 11.2% および 50 mg, 30.9%)

【0046】実施例 16

P 200 mg をピリジン 20 ml に溶解し、室温搅拌下に塩酸セミカルバジド 200 mg および塩酸チオセミカルバジド 400 mg をそれぞれ別々に加えて 50 分間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物をピリジン - クロロホルム - 酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NH₂CONHN - P (47) および NH₂C₆H₅CONHN - P (48) を得た。(160 mg, 73.0% および 70 mg, 31.2%)

【0047】実施例 17

P 300 mg をピリジン 50 ml に溶解し、o - アミノベンゼンチオール 10 ml を加えて 60℃ 加温搅拌下 18 時間反応せしめた。反応後、反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物を酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、BT - P (49) を得た。(350 mg, 98.9%)

【0048】実施例 18

P 100 mg をピリジン 8 ml に溶解し、室温搅拌下に二トロメタン、二トロエタンおよび二トロプロパンをそれぞれ別々に 8 ml ずつ加え、さらにナトリウムエチラートを 600 mg ずつ添加し、それぞれ 8.5 分間、70 分間、24 時間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液に 20% クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物をクロロホルム - 酢酸エチル - n - ヘキサンにて再沈殿を行い、NO₂ - P (51) 、 MeNO₂ - P (52) および EtNO₂ - P (53) を得た。(60 mg, 56.0%、40 mg, 36.5% および 70 mg, 62.5%)

【0049】実施例 19

P - Me 3 g アセトン 1.1 l とメタノール 300 ml の混液に溶解し、室温搅拌下に 10% 水酸化ナトリウム

水溶液365mlを加えた。次に20%クエン酸水溶液にて中和した後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をクロロホルム-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、Me₂CO-P(54)を得た。(2.6g、85.0%)

【0050】実施例 20

実施例19で得たMe₂CO-P 2.6gを常法によりDCHA塩とした。本DCHA塩全量をクロロホルム50mlおよびアセトニトリル25mlを加えて溶解した。次いでアスパラギン酸ジメチルエステル塩酸塩305gを加え、攪拌下に、WSC 3.0gを徐々に加えて反応せしめた。反応後、反応液を水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をピリジンに溶解し、常法により10%水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解を行った。20%クエン酸水溶液で中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、Me₂CO-P-diAsp(55)を得た。(870mg、24.6%)

【0051】実施例 21

P-Me 100mgをピリジン8mlに溶解し、室温攪拌下にβ-ヨノン8mlを加え、さらに10%水酸化ナトリウム水溶液を6ml加えて20分間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶離液；n-ヘキサン-酢酸エチル)にて精製し、1o-P-ジメチルエステル80mgを得た。得られた1o-P-ジメチルエステルをピリジンに溶解し、常法により10%水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解を行った。20%クエン酸水溶液で中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、1o-P 70mgを得た。得られた1o-Pを常法によりDCHA塩とした。本DCHA塩全量をクロロホルム10mlおよびアセトニトリル5mlを加えて溶解した。次いでアスパラギン酸ジメチルエステル塩酸塩70mgを加え、攪拌下に、WSC 50mgを徐々に加えて反応せしめた。反応後、反応液を水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をピリジンに溶解し、常法により10%水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解を行った。20%クエン酸水溶液で中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、1o-P-diAsp(56)を得た。(56mg、35.0%)

【0052】実施例 22

実施例21の中間体として得られる1o-P 180mgをピリジン60mlに溶解し、50℃加温攪拌下ヒドロキシルアミン塩酸塩1.2gを加え、40分間反応せし

めた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶離液；酢酸エチル-メタノール)にて精製し、NOH-Io-P 110mgを得た。得られたNOH-Io-Pを常法によりDCHA塩とした。本DCHA塩全量をクロロホルム20mlおよびアセトニトリル10mlを加えて溶解し、次いでアスパラギン酸ジメチルエステル塩酸塩110mgを加え、攪拌下に、WSC 110mgを徐々に加えて反応せしめた。反応後、反応液を水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をエタノールに溶解し、常法により2N水酸化カリウム水溶液にて加水分解を行った。20%クエン酸水溶液で中和後クロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH-Io-P-diAsp(57)を得た。(80mg、33.8%)

【0053】実施例 23

P-Me 300mgをピリジン50mlに溶解し、室温攪拌下にアセトフェノン5mlとp-アミノアセトフェノンをそれぞれ別々に加えた。10%水酸化ナトリウム水溶液をそれぞれに6mlずつ加えて3時間反応せしめた。反応後、それぞれの反応液に10%水酸化ナトリウム水溶液15mlを加え20%クエン酸水溶液にて中和後クロロホルム抽出を行い、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られたそれぞれの濃縮物を酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、PhCO-P(58)およびNH₂PhCO-P(59)を得た。(220mg、65.4%および180mg、52.6%)

【0054】実施例 24

NOH-P 150mgをテトラヒドロフラン5mlに溶解し、DCHA 90mgをジエチルエーテル1.5mlに溶解した液を加え常法にてDCHA塩とした。本DCHA塩全量をジメチルホルムアミド18mlに溶解し、10%塩酸D-グルコサミン水溶液4mlを加え、50℃加温攪拌下に2.5%DCCのクロロホルム溶液6mlを徐々に加え2.5時間反応せしめた。反応後、反応液に20%クエン酸水溶液とクロロホルムを加え、水洗分液後クロロホルム層を減圧濃縮した。得られた濃縮物をメタノール-クロロホルム-酢酸エチル-n-ヘキサンにて再沈殿を行い、NOH-P-NHglu(60)を得た。(40mg、20.6%)

【0055】実施例 25

質量分析

FAB質量分析法により本誘導体の質量を測定した。その測定結果の主なものを表1に示す。その代表例として、C₆-Pd-DP-diAsp(21)およびNOH-P(35)ジメチルエステルのFAB質量分析スペクトルを図1および図2に示す。

【0056】

【表1】

| 化合物 | 分子式 | 分子量 | MH ⁺ | M ⁺ | MH ⁺ - 2H ₂ O ⁺ |
|------------------------------------|--|---------|-----------------|----------------|---|
| (4) C ₆ -DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₂ | 997.20 | 997 | | / |
| (10) C ₆ -Ga-DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₄ Ga | 1099.93 | | | 1064 |
| (18) C ₁₀ -Ga-DP-diAsp | C ₁₀ H ₉ N ₆ O ₁₄ Ga | 1212.15 | | | 1175 |
| (20) C ₆ -Zn-DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₂ Zn | 1060.57 | | 1058 | / |
| (21) C ₆ -Pd-DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₂ Pd | 1100.41 | | 1100 | / |
| (22) C ₆ -In-DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₄ In | 1145.03 | | | 1109 |
| (23) C ₆ -Sn-DP-diAsp | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₄ Sn | 1147.90 | | 1147 | / |
| (32) C ₆ -P-diAsp(OMe) | C ₆ H ₈ N ₆ O ₁₃ | 982.47 | 983 | 982 | / |
| (34) C ₁₀ -P-diAsp(OMe) | C ₁₀ H ₁₀ N ₆ O ₁₃ | 1038.53 | 1039 | 1038 | / |
| (35) NOH-P-Me | C ₆ H ₈ N ₆ O ₅ | 637.74 | 638 | 637 | / |
| (36) SP-Me | C ₆ H ₈ N ₄ O ₇ | 624.69 | 625 | 624 | / |
| (55) Me ₂ CD-P-diAsp | C ₆ H ₁₀ N ₆ O ₁₂ | 864.91 | 865 | 864 | / |
| (56) Io-P-diAsp(OMe) | C ₆ H ₇ N ₆ O ₁₂ | 1055.24 | 1055 | | / |

【0057】実施例 26

核磁気共鳴分析

核磁気共鳴(¹H-NMR)法により本誘導体を測定した。その代表例として、C₆-DP-diAsp(4)およびC₁₀-In-DP-diAsp(26)の¹H-NMRスペクトルを図3および図4に示す。

【0058】実施例 27

紫外線吸収スペクトル分析(アルブミンテスト)

ポルフィリン化合物はアルブミン溶液中で、单量体あるいは二量体を形成することが知られている。この性質はアルブミン濃度を種々変えて分析を行うことで極大吸収値の移動または吸光係数の変動がみられることで分かる。したがって癌細胞との親和性を検討するには簡単なスクリーニングテストである。アルブミン54mgを3mLの生理食塩水に溶解し、1.8%濃度とする。次いでこれを10倍希釈して0.18%とした液を公比3で*

* 希釈して各アルブミン濃度(1.8、0.18、0.0306、0.02、0.0066、0.0022%)の液を調製した。一方、ポルフィリン誘導体1mgをリン酸緩衝液(pH 8.0)1mLに溶解し、生理食塩水で100mLにした。そしてアルブミン希釈液2mLとポルフィリン溶液2mLを混合し、混液のアルブミン濃度を0.9、0.09、0.03、0.01、0.0033、0.0011%とし紫外線吸収スペクトル測定(350~900nm)を行った。またアルブミン希釈液のかわりに生理食塩水およびメタノール溶液中でも同様に測定した。これらの測定結果を表2に示す。その代表例として、C₁₀-Ga-DP-diAsp(18)の紫外線吸収スペクトルを図5および図6に示す。

【0059】

【表2】

| 化 合 物 名 | 波長 (nm) | | |
|---|-----------|-------|---------------|
| | 生理 食塩水 | メタノール | 0.9%ア ルブミン |
| (4) C ₆ -DP-diAsp | 396 | 397 | 400 |
| (18) C ₁₀ -Ga-DP-diAsp | 401 | 401 | 408 |
| (28) NaHSO ₃ -P-Me | 672 | 663 | 668 |
| (35) NOH-P | 666 | 667 | 671 |
| (37) G' THZ-P | 698 | 670 | 674 |
| (38) N2OH-P | 658 | 660 | 662 |
| (39) 2NOH-SP | 675 | 673 | 676 |
| (40) NOAc-P | 668 | 666 | 671 |
| (41) BuHZ-P | 657 | 661 | 663 |
| (42) GHZ-P | 691 | 671 | 691 |
| (43) NHZ-P | 675 | 671 | 675 |
| (45) CHZ-P | 669 | 670 | 673 |
| (46) BA-P | 787 | 721 | 786 |
| (47) NH ₂ CONHN-P | 691 | 671 | 675 |
| (48) NH ₂ C ₂ NHN-P | 694 | 672 | 676 |
| (49) BT-P | 682 | 671 | 683 |
| (50) MCN-P | 729 | 698 | 723 |
| (51) NO ₂ -P | 668 | 667 | 672 |
| (52) MeNO ₂ -P | 668 | 666 | 671 |
| (53) EtNO ₂ -P | 670 | 668 | 672 |
| (60) NOH-P-NHg1u | — | 669 | — |

【0060】実施例 28

光照射による光殺細胞効果の判定 (in vitro)
特開平2-138280号に掲げた方法により試験を行った。HGC-27細胞 1×10^4 個 (1ml) をペトリ皿 (3.5 cm) に入れ2日間培養した。各薬剤を種々の濃度に調製し、先のペトリ皿に加え30分間培養し、リン酸緩衝液で洗浄した。2~3分放置後 col d spot PICL-SX (halogen lamp 150W) 5分間 (5.8 mw/cm²) 光照射した。なお光照射は600 nm以下の波長をカットして行った。その後、48時間培養し、生存細胞数を計測し

た。一方、対照として光照射中アルミホイルにて光を遮断した群を設けた。光細胞破壊率は ID₅₀ (50% 細胞増殖阻害率) により求めた。図7に C₆-DP-diAsp (4) および図8に C₁₀-Zn-DP-diAsp (24) による細胞増殖阻害率のグラフを示す。

【0061】実施例 29

C₆-DP-diAsp (4)、C₁₀-Ga-DP-diAsp (18) およびNOH-P (35) 注射液の調製
C₆-DP-diAsp (4)、C₁₀-Ga-DP-diAsp (18) およびNOH-P (35) 5gをそ

れぞれ別々にリン酸緩衝液 (pH 8.0) 90 ml を加えて溶解し、ついで pH 調整のため 0.1 N 水酸化ナトリウム 10 ml を加えて全量をそれぞれ 100 ml (50 mg/ml, pH 7.3) とした。次いで無菌濾過を行ながら無菌バイアルに 5 ml ずつ分注し、PDT 用薬剤とした。さらに必要に応じ分注後、使用時まで凍結保存した。

【0062】実施例 30

C_6 -DP-diAsp (4) 注射液の TLC および HPLC における純度

実施例 29 で得られた C_6 -DP-diAsp (4) 注射液の適量をオクチルシリカゲル (C_8) 薄層板 (RP-8、メルク社製) 上、メタノール-水混液 (9:1) を用いて展開した。その結果 Rf 0.5 付近にのみスポットを認めた。さらに、HPLC 分析 [カラム; ワコーシル 5 C_8 , 4.0 × 150 mm、溶離液; メタノール:水:酢酸 (80:15:5)、流速; 1.0 ml/min、検出波長: 395 nm] を行ったところ、Rt 6.3 分に 1 本のピークを認め純度は 90% 以上であった。

【0063】実施例 31

C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) 注射液の TLC および HPLC における純度

実施例 29 で得られた C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) 注射液の適量をオクチルシリカゲル (C_8) 薄層板 (RP-8、メルク社製) 上、メタノール-水混液 (95:5) を用いて展開した。その結果 Rf 0.5 付近にのみスポットを認めた。さらに、HPLC 分析 [カラム; ワコーシル 5 C_8 , 4.0 × 150 mm、溶離液; メタノール:水:酢酸 (85:10:5)、流速; 1.0 ml/min、検出波長; 405 nm] を行ったところ、Rt 5.9 分に 1 本のピークを認め純度は 95.0% 以上であった。

【0064】実施例 32

NOH-P (35) 注射液の TLC および HPLC における純度

実施例 29 で得られた NOH-P (35) 注射液の適量をオクタデシルシリカゲル (C_{18}) 薄層板 (RP-18、メルク社製) 上、メタノール-水混液 (4:1) を用いて展開した。その結果 Rf 0.5 付近にのみスポットを認めた。さらに、HPLC 分析 [カラム; ワコーシル 5 C_{18} , 4.0 × 250 mm、溶離液; メタノール:水:酢酸 (80:15:5)、流速; 0.5 ml/min、検出波長; 405 nm] を行ったところ、Rt 7.8 分に 1 本のピークを認め純度は 96.0% 以上であった。

【0065】実施例 33

C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液の in vitro 中での安定性

C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液の純度をそれぞれ経時的に TLC 分析および HPLC 分析することにより本薬剤の in vitro 中での安定性を評価した。実施例 29 に従って調製した C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液をそれぞれ生理食塩水で 5 倍に希釈し 10 mg/ml の濃度とし室温、遮光下に静置し、本剤調製時、1 日、1 週間、および 1 か月後に実施例 32 に準じて、各薬剤の TLC および HPLC 純度を測定した。その結果、各測定時点での各薬剤の化学的純度は TLC 分析では 4 を除いてそれぞれ 1 スポット、HPLC 分析では約 95.0%、および 95.0% であり各薬剤は少なくとも 1 か月安定であることが分かった。なお 4 は少なくとも 1 週間は安定であった。

【0066】実施例 34

C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液の新鮮凍結血漿 (in vivo) 中での安定性

C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液の血漿中での純度をそれぞれ経時的に TLC 分析および HPLC 分析することにより各薬剤の疑似 in vivo 中での安定性を評価した。実施例 29 と同様に調製した C_6 -DP-diAsp (4)、 C_{10} -Ga-DP-diAsp (18) および NOH-P (35) 注射液を生理食塩水でそれぞれ 2.5 倍に希釈し 20 mg/ml の濃度とし、これと同量の新鮮凍結血漿を加えて (10 mg/ml, pH 7.1)、体温 (36.5°C)、遮光下に静置し、各薬剤調製時、1 日、1 週間、2 週間、3 週間および 1 か月後に実施例 32 に準じて、各薬剤の TLC および HPLC 純度を測定した。その結果、各測定時点での各薬剤の化学的純度は TLC 分析ではそれぞれ 1 スポット、HPLC 分析では約 90.0%、95.0% および 95.0% であり各薬剤は少なくとも 1 か月間安定であることが分かった。

【0067】

【発明の効果】本発明のポルフィリン誘導体は癌細胞への集積性、外部エネルギーに対する反応性ならびに癌細胞の破壊作用を有し、しかも正常細胞に対して毒性を発現することがないから、癌治療薬あるいは癌診断薬として究めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 C_6 -Pd-DP-diAsp (21) の質量分析スペクトル (FAB-NBA) を示す図である。

【図 2】 NOH-P (35) ジメチルエステルの質量分析スペクトル (FAB-NBA) を示す図である。

【図 3】 C_6 -DP-diAsp (4) の核磁気共鳴スペクトル (1 H-NMR) を示す図である。

【図4】 $C_{10}-In-DP-diAsp$ (26) の核磁気共鳴スペクトル (^1H-NMR) を示す図である。

【図5】 $C_{10}-Ga-DP-diAsp$ (18) の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図6】 $C_{10}-Ga-DP-diAsp$ (18) の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図7】 $C_6-DP-diAsp$ (4) 投与後の細胞増殖阻害率を示す図である。

【図8】 $C_{10}-Zn-DP-diAsp$ (24) 投与後の細胞増殖阻害率を示す図である。

【符号の説明】

1 ポルフィリン溶液と生理食塩水の混液

(アルブミン濃度 0 %)

2 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液

* (アルブミン濃度 0.0011 %)

3 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液
(アルブミン濃度 0.0033 %)

4 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液
(アルブミン濃度 0.01 %)

5 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液
(アルブミン濃度 0.03 %)

6 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液
(アルブミン濃度 0.09 %)

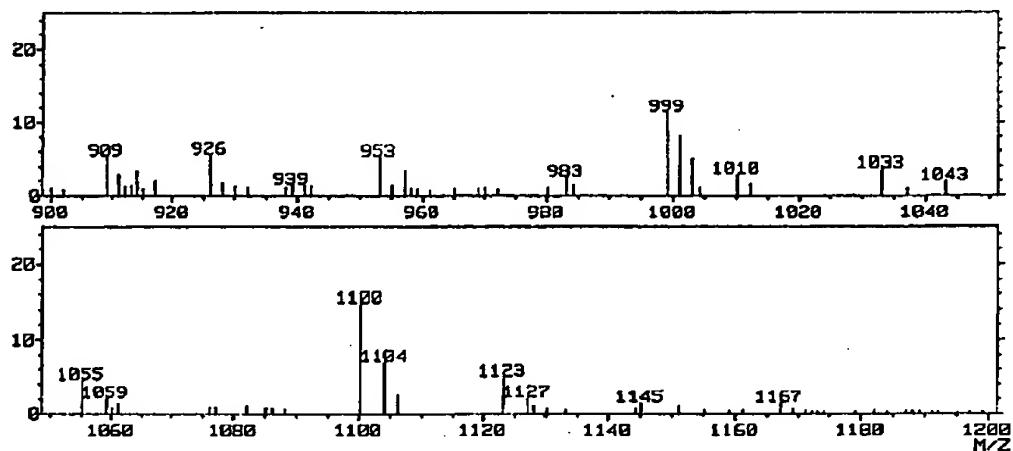
10 7 ポルフィリン溶液とアルブミン溶液の混液
(アルブミン濃度 0.9 %)

8 ポルフィリン溶液とメタノールの混液

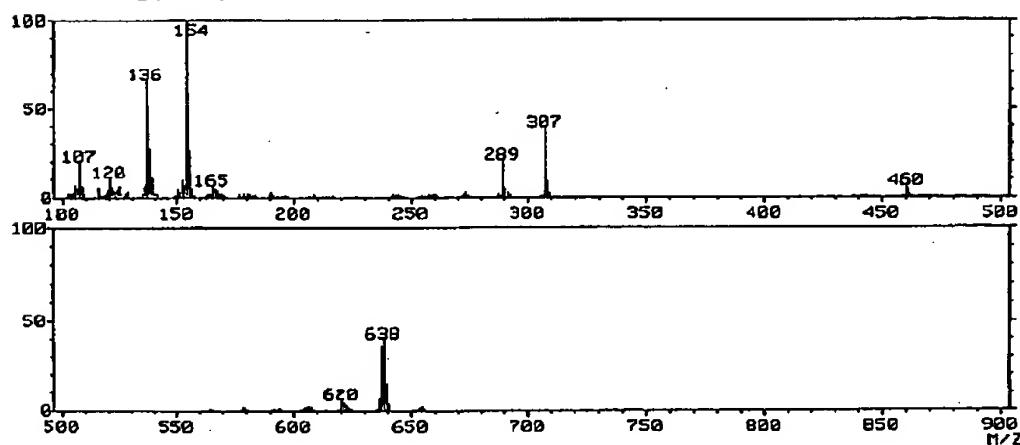
9 光照射有り

* 10 光照射無し

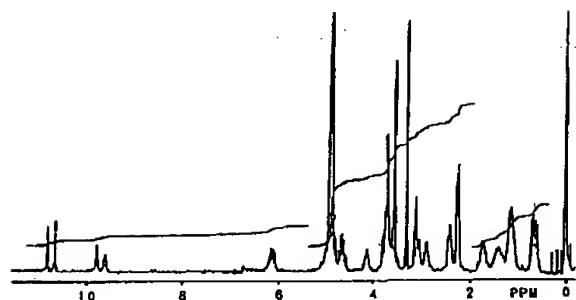
【図1】



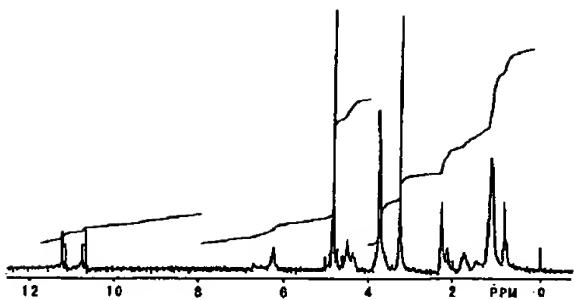
【図2】



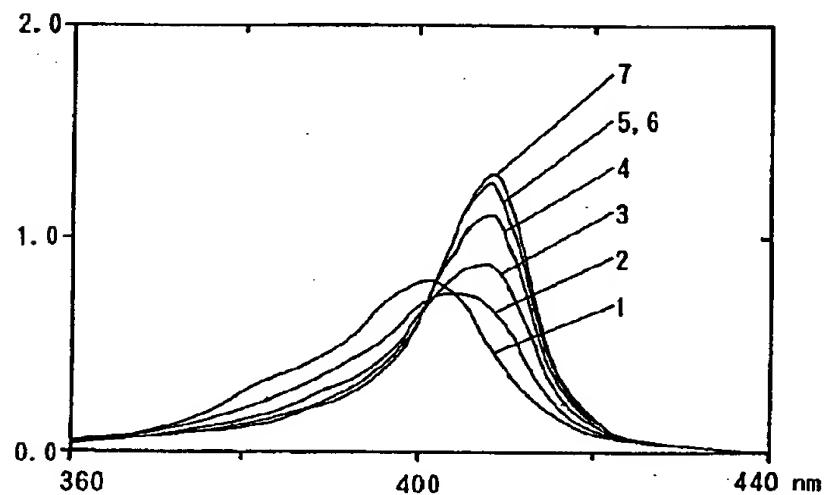
【図3】



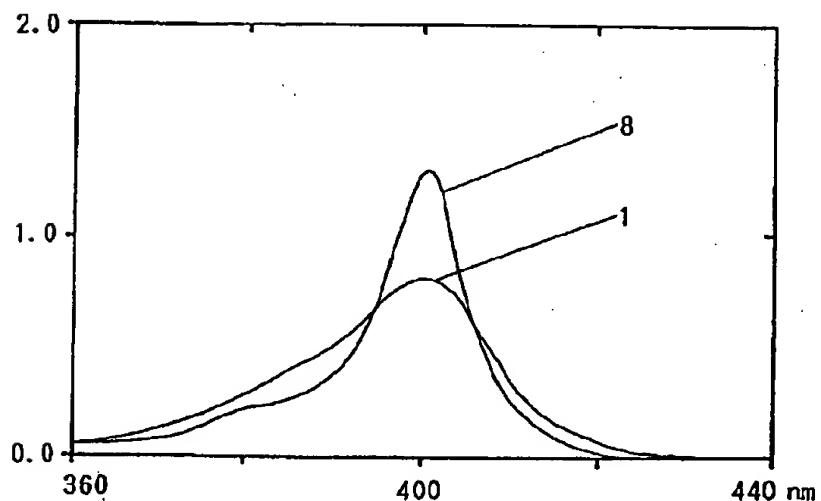
【図4】



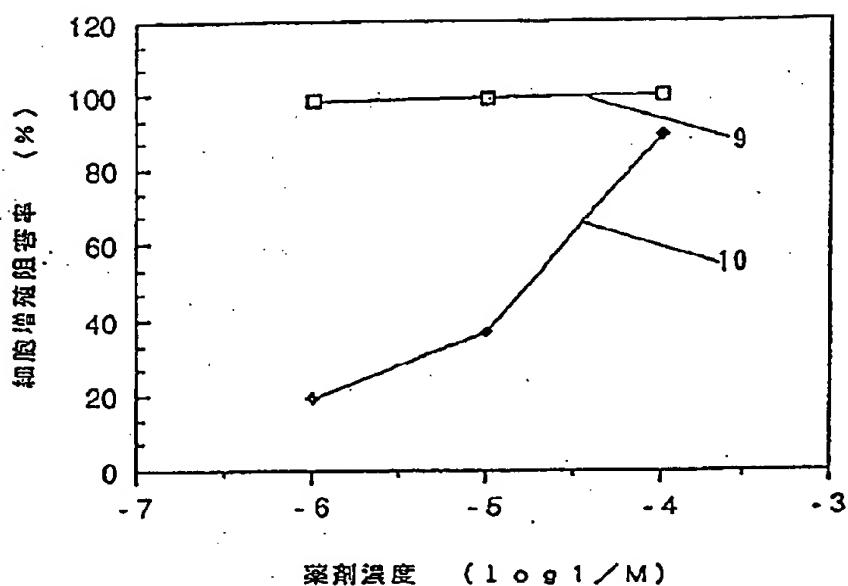
【図5】



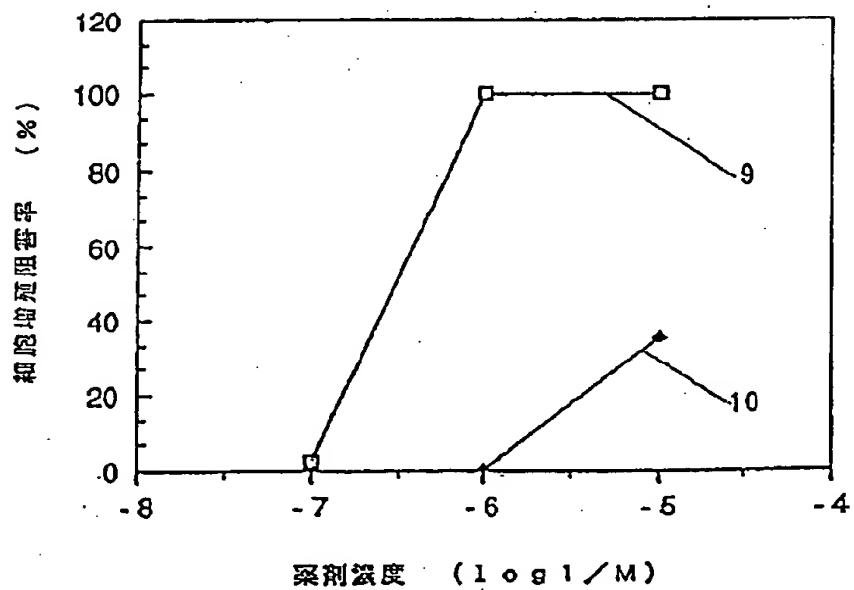
【図6】



【図7】



【図8】

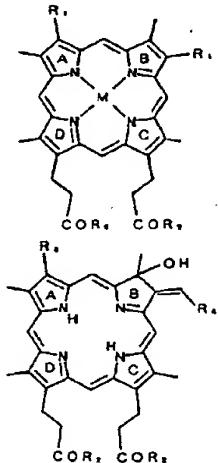


(54) PORPHYRIN DERIVATIVE AND ITS USE

(11) 5-97857 (A) (43) 20.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-323597 (22) 4.10.1991
 (71) TOYO HATSUKA KOGYO K.K. (72) ISAO SAKATA(4)
 (51) Int. Cl⁸. C07D487/22, A61K31/40, A61K41/00, A61K49/00

PURPOSE: To provide a new (metallo)porphyrin useful as a sensitizer for photo-physico-chemical diagnosis and therapy (PDT) composed of single component, being excellent instability, water-solubility and accumulation to cancer tissue and quickly releasable from normal tissue to enable the reduction of phototoxicity.

CONSTITUTION: The compound of formula I (R₁ is CH(OR)CH₃; R is alkyl; R₂ is residue obtained by removing H from amino acid; M is 2H, Ga, Zn, etc.), its metal complex or a compound of formula II (R₂ is OH, amino acid residue, etc.; R₃ is CH=CH₂, CH(OR)CH₃, etc.; R₄ is CHO, CH(OH)OSO₂Na, etc.) (including the position isomer obtained by exchanging the functional groups on the side chains of the ring A and the ring B), e.g. 2,4-bis(1-propoxyethyl)-deuteroporphyrinyl-diaspartic acid. The compound of formula I can be produced by introducing a metal to a porphyrin compound having R₁ and bonding an amino acid residue R₂ to the product. The compound has an absorption wavelength of $\leq 600\text{nm}$ and $\geq 670\text{nm}$ to enable the use of a titanium sapphire laser.

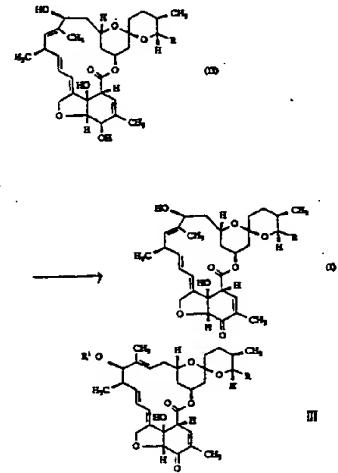


(54) 15-HYDROXYMILBEMYCIN DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

(11) 5-97859 (A) (43) 20.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-258035 (22) 4.10.1991
 (71) SANKYO CO LTD (72) AKIO SAITO(1)
 (51) Int. Cl⁸. C07D493/22//A61K31/365

PURPOSE: To provide a new 15-hydroxymilbemycin derivative useful as an intermediate capable of producing a milbemycin derivative having ether bond at 13-site and exhibiting excellent antihelmintic activity in high production yield.

CONSTITUTION: The compound of formula I (R is methyl, ethyl, isopropyl or t-butyl), e.g. 5-oxo-15-hydroxy- Δ 13,14-milbemycin A₄. The compound can be produced in high yield by oxidizing a compound of formula II with manganese dioxide, thereby selectively and exclusively oxidizing the 5-OH in three OH groups. A 13-ether compound of formula III can be produced in high yield by reacting the compound of formula I with an alcohol of formula R'OH (R' is 1-6C alkyl or 3-6C cycloalkyl which may have 1-3 substituents (e.g. halogen, 1-3C alkyl or 1-3C alkoxy) in the presence of trifluoromethanesulfonic acid.) The 13-ether compound can easily be converted to a 5-hydroxy compound by treating with a reducing agent such as sodium borohydride.



(54) PRODUCTION OF 13-ETHER-SUBSTITUTED MILBEMYCIN DERIVATIVE

(11) 5-97860 (A) (43) 20.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-258036 (22) 4.10.1991
 (71) SANKYO CO LTD (72) AKIO SAITO(1)
 (51) Int. Cl⁸. C07D493/22//A61K31/365

PURPOSE: To economically obtain in high yield the title compound bearing ether link at 13-site having high anthelmintic activity without the need of using heavy metals such as expensive silver or toxic mercury causing environmental pollution.

CONSTITUTION: The objective compound can be obtained advantageously by reaction of (A) a compound of formula R'OH (R' is 1-6C alkyl or 3-6C cycloalkyl, these may bear 1 to 3 substituent(s) (halogen, 1-3C alkyl, 1-3C alkoxy, etc.)) with (B) a compound of formula I or II (R² is methyl, ethyl, isopropyl or t-butyl; R³ is H, R⁴CO, 1-6C alkyl or 3-6C cycloalkyl, these may bear 1 to 3 substituent(s) (halogen, 1-3C alkyl, 1-3C alkoxy, etc.); R⁴ is H, 1-3C alkyl or phenyl, these may bear 1 to 3 substituent(s) (halogen, 1-3C alkyl, 1-3C alkoxy, etc.); X is OH, protected OH or oxo) in the presence of trifluoromethanesulfonic acid.

